

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-222590

(43) 公開日 平成7年(1995)8月22日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	8828-4B		
1/21				
9/02		9281-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 16 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-35450

(22) 出願日 平成6年(1994)2月8日

(71) 出願人 000002071

チッソ株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

(72) 発明者 善野 修平

神奈川県横浜市金沢区乙舩町10番3号

(72) 発明者 白石 慎治

神奈川県横浜市金沢区乙舩町10番3号

(72) 発明者 西郷 薫

東京都杉並区和泉4丁目31番7号

(74) 代理人 弁理士 野中 克彦

(54) 【発明の名称】 アルテロモナス ハネダイ のルシフェラーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 発光細菌 Al teromonas hane dai ルシフェラーゼ遺伝子を提供すること。【構成】 配列の長さ2124の塩基配列を有するDN Aからなるルシフェラーゼ遺伝子。この遺伝子は354個のアミノ酸からなる分子量39,943の $\alpha$ サブユニット蛋白質と327個のアミノ酸からなる分子量36,895の $\beta$ サブユニット蛋白質をコードしている。この遺伝子を含有する組換えベクター、このベクターを含む細菌。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表される塩基配列を含む、ルシフェラーゼ アルファ サブユニットの遺伝子。

## 【配列表1】

【請求項2】 配列番号2で表される塩基配列を含む、ルシフェラーゼ ベータ サブユニットの遺伝子。

## 【配列表2】

【請求項3】 配列番号3で表される塩基配列を含む請求項1記載のルシフェラーゼ アルファ サブユニットの遺伝子。

## 【配列表3】

【請求項4】 配列番号4で表される塩基配列を含む請求項2記載のルシフェラーゼ ベータ サブユニットの遺伝子。

## 【配列表4】

【請求項5】 塩基配列が配列番号5で表されるルシフェラーゼ遺伝子。

## 【配列表5】

【請求項6】 配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するルシフェラーゼアルファ サブユニット。

## 【配列表6】

【請求項7】 配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するルシフェラーゼベータ サブユニット。

## 【配列表7】

【請求項8】 塩基配列が配列番号1および配列番号2で表されるDNAを有する組換えベクター。

【請求項9】 配列番号3および配列番号4で表される塩基配列を有する遺伝子がプラスミドベクターへ挿入された請求項8記載の組換えベクター。

【請求項10】 配列番号1および配列番号2で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えベクターを含有する細菌。

【請求項11】 塩基配列が配列番号1および配列番号2で表されるDNAを含む組換えベクターで修飾される細菌を培養することからなる配列番号6および配列番号7で表されるアミノ酸配列を含む酵素の製法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は発光細菌アルテロモナス ハネダイのルシフェラーゼ遺伝子、酵素蛋白、該遺伝子を含む組換えベクター、および該組換えベクターを含有する細菌に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 発光細菌ルシフェラーゼは、還元型フラビンモノヌクレオチド（以下FMNH<sub>2</sub>という）と長鎖脂肪族アルデヒドを酸化し、酸化型フラビンモノヌクレオチド（以下FMNという）と長鎖脂肪族カルボン酸を生成する反応を触媒する。この際、青緑色の光を発する。細菌ルシフェラーゼはαサブユニットとβサブユニットからなるヘテロダイマーで、αとβのそれぞれのサ

ブユニットはluxA及びluxB遺伝子にコードされている。本酵素は生体外で長鎖アルデヒドと還元型FMNの共存により発光反応を触媒する。還元型FMNは空气中で即時に自動酸化されるため、一般的にはFMN還元酵素を反応系に共存させ、ルシフェラーゼと共役反応させて、連続発光させることが多い。長鎖アルデヒドとしてはデカナールが一般的に用いられる。このように細菌ルシフェラーゼは生体外でたやすく発光反応を行なえる為、診断検査薬などの標識酵素として有用である。以上のように、細菌ルシフェラーゼは発光反応を触媒する為高感度検出に有用で、その遺伝子の取得により、大量に本酵素を調製することが出来る。

【0003】 細菌ルシフェラーゼはlux遺伝子のluxAとluxBにコードされている。今までに、数多くの発光細菌のルシフェラーゼ遺伝子が単離され、その1次構造が明らかにされている。[Baldwin, T. O., T. Berends, T. A. Bunch, T. F. Holzman, S. K. Rausch, L. Shammansky, M. L. Treat, and M. M. Ziegler. 1984. バイオケミストリー (Biochemistry) 23:3663-3667; Belas, R., A. Mileham, D. Cohn, M. Hilmen, M. Simon, and M. Silverman. 1982. サイエンス (Science) 218:791-793; Cohn, D. H., R. C. Ogden, J. N. Abelson, T. O. Baldwin, K. H. Nealson, M. I. Simon, and A. J. Mileham. 1983. プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 80:120-123; Delong, E. F., D. Steinhauer, A. Israel, and K. H. Nealson. 1987. ジーン (Gene) 54:203-210; Engebrecht, J., K. H. Nealson, and M. Silverman. 1983. セル (Cell) 32:773-781; Evans J. F., S. McCracken, C. M. Miyamoto, E. A. Meighen, and A. F. Graham. 1983. ジャーナル オブ バクテリオロジー (J. Bacteriol.) 153:543-545; Frackman, S., M. Anhalt, and K. H. Nealson. 1990. ジャーナル オブ バクテリオロジー (J. Bacteriol.) 172:5767-5773; Mancini, J. A., M. Boylan, R. R. Soly, A. F. Graham, and E. A. Meighen. 1988. ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.) 263:14308-14314; Szittner, R., and

10

20

30

40

50

E. Meighen, 1990, ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.) 265:16581-16587.]

しかしながら、アルテロモナス ハネダイのルシフェラーゼ遺伝子に関しては報告されていない。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、鋭意研究の結果、発光細菌 *Alteromonas hanedai* (ATCC 33224) からルシフェラーゼ遺伝子を単離し、その一次構造を明らかにすることに成功し、また該遺伝子を大量に発現する大腸菌を作出することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の目的は上述の技術的事情にかんがみ、発光細菌 *Alteromonas hanedai* のルシフェラーゼ遺伝子および酵素を提供することであり、さらに該遺伝子を含む組換えベクター、および該組換えベクターを含む細菌を提供することである。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、つぎの(1)～(11)の構成を有する。

(1) 配列番号1で表される塩基配列を含む、ルシフェラーゼ・アルファ・サブユニットの遺伝子。

(2) 配列番号2で表される塩基配列を含む、ルシフェラーゼ・ベータ・サブユニットの遺伝子。

(3) 配列番号3で表される塩基配列を含む前記第

(1)項記載のルシフェラーゼ・アルファ・サブユニットの遺伝子。

(4) 配列番号4で表される塩基配列を含む請求項2記載のルシフェラーゼ・ベータ・サブユニットの遺伝子。

(5) 塩基配列が配列番号5で表されるルシフェラーゼ遺伝子。

(6) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ・アルファ・サブユニット。

(7) 配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ・ベータ・サブユニット。

(8) 塩基配列が配列番号1および配列番号2で表されるDNAを含有する組換えベクター。

(9) 配列番号3および配列番号4で表される塩基配列を有する遺伝子がプラスミドベクターへ挿入された前記

(8)項記載の組換えベクター。

(10) 配列番号1および配列番号2で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えベクターを含有する細菌。

(11) 塩基配列が配列番号1および配列番号2で表されるDNAを含む組換えベクターで修飾されてなる細菌を培養することからなる配列番号6および配列番号7で表されるアミノ酸配列を含む酵素の製法。

【0006】本発明の構成と効果につき以下に詳述する。本発明の酵素遺伝子は、配列番号1と配列番号2で表わされる配列に、それぞれ長さ1065と984のヌ

クレオチド鎖を含むのが特徴である。好ましく示す配列としては、配列番号3および配列番号4で表わされるヌクレオチド鎖を含む。具体的には塩基配列が配列番号5で表わされ、配列の長さが2124のDNAを示す。

【0007】配列の種類はゲノムDNAであり、発光細菌 *Alteromonas hanedai* (ATCC 33224) から単離されるものである。その配列の特徴は配列番号5の塩基番号38から1099までの領域に、354個のアミノ酸から成る分子量39,943のルシフェラーゼαサブユニットと配列番号5の塩基番号1141から2121までの領域に、327個のアミノ酸から成る分子量36,895のルシフェラーゼβサブユニットをコードしていることである。本発明の酵素遺伝子産物は、細菌ルシフェラーゼに由来する発光活性を有し、たとえば、還元型FMNとデカナルを酸化する発光反応を触媒する活性を有するものである。本発明の酵素は、配列番号1, 2, 3, 4および5の塩基配列から予測される配列番号6および7で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質である。その蛋白質は354個のアミノ酸からなる分子量39,943のルシフェラーゼαサブユニットと327個のアミノ酸からなる分子量36,895のルシフェラーゼβサブユニットとからなり、発光細菌中で発光活性を有する。

【0008】本発明の組換えベクターは、塩基配列が配列番号1および2で表されるDNAを含有する。すなわち、本発明の組換えベクターは、配列番号1および2で表される塩基配列を有するDNAと、機能的同等物を含む。「機能的同等物」とは適当な宿主による発光細菌のルシフェラーゼ発光活性を有する酵素の産生において、実質的に同じ結果を得るために実質的に同じ方法で利用できるDNA断片のことである。すなわち、塩基配列が異なっても、同一のアミノ酸配列を有する蛋白をコードしえるDNA断片や若干の塩基配列の相違に伴う若干のアミノ酸配列の違いがあるもののルシフェラーゼ発光活性を有する蛋白をコードしえるDNA断片のことを意味する。具体的には配列番号1および2の塩基配列や部位特異的変異導入された配列番号1および2に由来する塩基配列を示すことになる。たとえば、該塩基配列を含有するDNA断片を挿入したプラスミドベクターなどである。このベクターとしては、pUC (C. Yanisch-Perron, J. Vieira & J. Messing, ジーン (Gene), 33, 110-115 (1985)) などが使用できる。

【0009】図3はルシフェラーゼ発現ベクターの構築工程を示す。すなわち、ルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミドpAH18からインサートDNAの一部に相当する約3kbのXbaI/EcoRI断片をpUC13のXbaI/EcoRI切断部位に挿入し、発現ベクターpALF1を作製した。結果的にpALF1は大腸菌のラクトースオペロンのlacプロモーターの支配下

にルシフェラーゼ遺伝子が配置されており、ルシフェラーゼが発現されるようになっている。本発明の細菌は、配列番号1および2で表される塩基配列を含有する組換えベクターDNAを含む。本発明の細菌の特徴はルシフェラーゼ発光活性を有する蛋白質を生産することである。本発明の酵素の製法は、塩基配列が配列番号1および2で表されるDNAを含む組換えベクター（発現ベクター）で修飾された細菌を培養し、配列番号6および7で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質を製造することである。細菌としては、大腸菌など、培地としてはLB培地などをあげることができる。以下、実施例にて本発明で重要な遺伝子の単離とその同定に関する手順をのべる。

#### 【0010】

##### 【実施例】

##### 実施例1

Alteromonas hanedaiのluxA遺伝子の単離

発光細菌Alteromonas hanedai (ATCC33224)をPhotobacterium 20 培地で26℃、一晩振とう培養した。10000rpmで遠心分離し集菌した後、トリス塩酸・EDTA緩衝液（以下、TE緩衝液という）に菌体を懸濁した。37℃で1時間リゾチーム処理した後、ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略す）を添加して50℃で3時間プロテナーゼK処理をした。その後、フェノール処理を3回行い、エタノール沈殿し、乾燥した後、TE緩衝液に溶解し再度プロテナーゼK処理した。その後フェノール処理3回後エタノール沈殿しゲノムDNAを回収した。

【0011】今までに明らかにされているルシフェラーゼαサブユニットのアミノ酸配列で保存されている領域に対応する図1に示す合成オリゴヌクレオチド・プライマーLUX1とLUX2を用いてA. hanedaiゲノムDNAを鋳型にしてPCR法 [Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlic (1988) サイエンス (Science) 239 487] によりluxA遺伝子を増幅し、そのDNA断片をpUC8プラスミドDNA [Hanna, 40 Z., Fregeau, C., Prefontaine, G., Brousseau, R. (1984) ジーン (Gene), 30 247] のHincII切断部位に挿入した。

#### 【0012】塩基配列の決定

[Hattori, M. & Sakaki, Y. (1986) アナリティカルバイオケミストリー (Anal. Biochem.) 152 232] からA. hane  
daiのluxA遺伝子であることを確認した。このプラスミドDNAからluxA遺伝子部分のDNA断片を 50

PstI/EcoRIで切り出し、完全鎖長ルシフェラーゼ遺伝子 (luxA及びluxB) のスクリーニングのプローブDNAとして用いた。プローブDNAの<sup>32</sup>P標識はランダム・プライミング法 [Feinberg, A. & Vogelstein, B. (1983) アナリティカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 132 6] で行った。

#### 【0013】実施例2

発光細菌遺伝子のラムダ・ファージライブラリーの作製  
上記のゲノムDNAの50μgに10単位の制限酵素Sau3AIを37℃で作用させた。反応時間5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120分で一部分取り、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えることにより反応を停止した。それぞれの一部をアガロースゲル電気泳動にかけゲノムDNAの部分分解の度合を確認した。各時間ごとの反応液を1本にまとめてエタノール沈殿回収した。それを少量のTE緩衝液に溶解後、アガロースゲル電気泳動にかけ9~23キロベース (kb) の画分を電気泳動操作で回収した。9~23Kb画分を含むアガロースゲルから前記9~23Kb画分のDNAを透析チューブ内に電気泳動的に溶出し、フェノール処理3回後エタノールで沈殿した。それを約200ng/μlになるようにTE緩衝液に溶解した。制限酵素BamHIであらかじめ切断してアルカリフォスファターゼ (DNAの5'末端の脱リン酸化を触媒する酵素) で処理されたEMBL3ファージDNAに、前記9~23Kb画分のDNAをT4DNAリガーゼ (DNA鎖どうしまたは、DNAとRNAの3'OHと5'P末端をホスホジエステル結合でつなぐ酵素) を用いて16℃で一晩連結反応した。連結反応液をパッケージング抽出液と混合し、22℃で2時間反応して組換えファージを得た。このファージを遺伝子ライブラリーとした。

#### 【0014】実施例3

完全鎖長のルシフェラーゼ遺伝子の単離

実施例2で作製の遺伝子ライブラリーのタイター測定後、プレート当たり1万個のファージがブラックを形成するようにまき、37℃で一晩培養した。4℃に2時間放置後、それぞれのプレートに対して、ナイロンメンブレン・フィルターで2枚ずつファージをトランスファーした。

【0015】フィルターを変性し、中和後、紫外線照射した。そして、ハイブリダイゼーション液 {20mlの6×SET緩衝液 [20×SET緩衝液: 3MのNaCl, 0.6Mのトリス塩酸 (pH8.0), 0.04MのEDTA], 10×Denhardt's液 (牛血清アルブミン、ポリビニルピロリドン、Ficollの各0.2W/V%溶液)、0.1W/V%SDS、サケ精子DNA (熱変性したもの50μg/ml)} に入れ、68℃で1時間保温した。さらに液を入れ替えて1時間保温後、<sup>32</sup>P標識したA. hanedaiのluxAのプロ

ープを加え65℃で一晩ハイブリダイゼーションした。溶液を捨てフィルターを2×SET緩衝液で洗浄後、0.2×SET緩衝液65℃で20分間振とうした。この操作を2回繰り返した後、風乾しオートラジオグラフィにかけた。フィルターと現像したX線フィルムを重ねインクマーカの位置をフィルム上に写し取った。

【0016】一枚のプレートからできた二枚のフィルム上でシグナルが重なりと特定されたファージ(クローン)を約1000個の組換えファージから1個得た。このクローンをλAH18と名付けた。このインサートDNAをpUC13プラスミドのSalI部位に挿入し、pAH18を得た。このプラスミドDNAを鋳型として、PCRクローンの塩基配列を基に調製した合成オリゴヌクレオチドプライマー(20mer)を用いて、ジデオキシ法[Hattori, M. & Sakaki, Y. (1986) アナリティカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 152 232]で塩基配列を決定した。

【0017】また、新たにその塩基配列を基に合成プライマーを作製し、ジデオキシ法で塩基配列を決定した。図2にその制限マップを示した。決定された塩基配列で表される遺伝子は、配列番号5に示される通りで、2124bpの長さで、luxA遺伝子及びluxB遺伝子に対応し、塩基番号38~1099までは354個のアミノ酸から成る分子量39,943のルシフェラーゼのサブユニットを、塩基番号1141~2121までは327個のアミノ酸から成る分子量36,895のルシフェラーゼβサブユニットをそれぞれコードすると考えられた。

【0018】実施例4  
ルシフェラーゼ遺伝子の発現ベクターの構築とその形質転換株の調製(図3参照)

組換えプラスミドpAH18のDNAをXbaI及びEcoRIで消化し、3Kbの断片を回収し、プラスミドpUC13のXbaI/EcoRI部位にT4DNAリガーゼで連結反応した。その連結反応液の一部を大腸菌D1210株に形質転換した。該形質転換株からプラスミドDNAを調製し、インサートDNAが3Kbのものを選擇した。そのプラスミドをpALF1と名付けた。pALF1はラクトースオペロン(lac)のプロモーターの支配下にルシフェラーゼ遺伝子を配置した形となっており、ルシフェラーゼを発現するように構築されている。

【0019】実施例5

ルシフェラーゼの調製とその活性測定

この形質転換株の一晩培養液0.25mlをアンピシリンを含有したLB液体(10ml)培地に植菌し、37℃で2時間振とう培養後、最終濃度が1mMになるよう\*

配列

1 ATG AAJ TTK GGL AAK ATM TGR TTK QRS TAK CAJ CCL CCL GGL GAJ ACL 48

\*にイソプロピルβ-D(-)-チオガラクトピラノシド(IPTGと略す)を添加し、さらに3時間培養した。IPTG誘導処理した培養液3.0mlを10000rpmで遠心分離し上清を除く。菌体を50mMリン酸カリウム・1mMジチオスレイトール緩衝液0.75mlに懸濁し超音波破碎した。12000rpm、4℃で30分間遠心分離し、その上清を細胞抽出液とした。

【0020】その細胞抽出液に対して、発光活性を調べた。ルシフェラーゼ発光の確認は、1mM FMN25μl、細胞抽出液10μlを含む全量500μlの50mMリン酸緩衝液pH7.0、25℃に10mg/mlのNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>溶液10μlを加えて還元状態とし、これに500μlの空気飽和のデカナル溶液を急速に加えて、暗室にて肉眼で発光することを確認した。デカナル溶液は、純デカナル10μlを0.5W/V%BSA, 0.05W/V%トリトンX-100を含む100mlの50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に加えて調製した。また、この液体培養菌体に純デカナルを加え、培養容器を振とうすると発光が認められた。以上の結果からpALF1のインサートDNAであるこの遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子であることが確認された。

【0021】

【発明の効果】本発明の酵素遺伝子は、発光細菌*A. h. anedai*のルシフェラーゼの遺伝子として初めて単離されたものである。適当な宿主、例えば大腸菌を宿主とすることにより、その大腸菌から大量に該酵素蛋白を調製することができる。その発現ベクターを適当な宿主たとえば、大腸菌に導入することにより、発光細菌のルシフェラーゼを大量に発現する生物あるいは微生物を作出することができ、さらにその遺伝子導入生物から抽出することにより該還元酵素を大量に調製することができる。該還元酵素は上述した機能から、多くの測定法に応用でき、たとえば診断薬や検査薬として有用である。

【0022】

【配列表】

【0023】配列番号: 1

配列の長さ: 1065

配列の型: 核酸

鎖の数: 1

トポロジー: 直鎖

配列の種類: ゲノムDNA

起源

生物名: *Alteromonas hanedai*

株名: ATCC33224

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

特徴を決定した方法: E

【0024】

9

10

1 Met Lys Phe Gly Asn Ile Cys Phe Ser Tyr Gln Pro Pro Gly Glu Thr 16

49 CAK AAJ CAJ GTL ATG GAR WGZ TTK ATM WGZ XTY GGL GTL GCL QRS GAJ 96  
17 His Lys Gln Val Met Asp Arg Phe Ile Arg Leu Gly Val Ala Ser Glu 32

97 GAJ XTY GGL TTK GAK ACL TAK TGG ACL XTY GAJ CAK CAK TTK ACL GAJ 144  
33 Glu Leu Gly Phe Asp Thr Tyr Trp Thr Leu Glu His His Phe Thr Glu 48

145 TTK GGL XTY ACL GGL AAK XTY TTK GTL GCL GCL GCL AAK XTY XTY GGL 192  
49 Phe Gly Leu Thr Gly Asn Leu Phe Val Ala Ala Ala Asn Leu Leu Gly 64

193 WGZ ACL AAJ ACL XTY CAJ GTL GGL ACL ATG GGL GTL GTL XTY CCL ACL 240  
65 Arg Thr Lys Thr Leu Gln Val Gly Thr Met Gly Val Val Leu Pro Thr 80

241 GCL CAK CCL GTL WGZ CAJ XTY GAJ GAK GTL XTY XTY XTY GAK CAJ ATG 288  
81 Ala His Pro Val Arg Gln Leu Glu Asp Val Leu Leu Leu Asp Gln Met 96

289 QRS AAJ GGL WGZ TTK AAK TTK GGL GTL GTL WGZ GGL XTY TAK CAK AAJ 336  
97 Ser Lys Gly Arg Phe Asn Phe Gly Val Val Arg Gly Leu Tyr His Lys 112

337 GAK TTK WGZ GTL TTK GGL GTL AAK ATG GAJ GAK QRS WGZ GGL ATM ACL 384  
113 Asp Phe Arg Val Phe Gly Val Asn Met Gly Asp Ser Arg Gly Ile Thr 128

385 CAJ QRS TTK CAK ACL ATG ATM ATM GAK GGL GTL AAJ ACL GGL WGZ ATM 432  
129 Gln Ser Phe His Thr Met Ile Ile Asp Gly Val Lys Thr Gly Arg Ile 144

433 QRS QRS GAK GGL GAJ CAK ATM GAJ TTK CCL GAJ GTL GAJ GTL TAK CCL 480  
145 Ser Ser Asp Gly Glu His Ile Glu Phe Pro Glu Val Glu Val Tyr Pro 160

481 ACL GCL TAK QRS AAJ GAJ XTY CCL ACL TGK ATG ACL GCL GAJ QRS GCL 528  
161 Thr Ala Tyr Ser Lys Glu Leu Pro Thr Cys Met Thr Ala Glu Ser Ala 176

529 QRS ACL ACL GAJ TGG XTY GCL GAJ WGZ GGL XTY CCL ATG GTL XTY QRS 576  
177 Ser Thr Thr Glu Trp Leu Ala Glu Arg Gly Leu Pro Met Val Leu Ser 192

577 TGG ATM ATM GGL ACL AAK GAJ AAJ AAJ GCL CAJ ATG GAJ XTY TAK AAK 624  
193 Trp Ile Ile Gly Thr Asn Glu Lys Lys Ala Gln Met Glu Leu Tyr Asn 208

625 GAJ ATM GCL ATM GAJ CAK GGL CAK GAK ATM ACL AAJ ATM GAK CAK TGK 672  
209 Glu Ile Ala Ile Glu His Gly His Asp Ile Thr Lys Ile Asp His Cys 224

673 ATG ACL TTK ATM TGK QRS GTL GAK AAK GAK QRS AAK AAJ GCL WGZ GAK 720  
225 Met Thr Phe Ile Cys Ser Val Asp Asn Asp Ser Asn Lys Ala Arg Asp 240

721 GTL TGK WGZ GCL TTK XTY GCL AAK TGG TAK GAK QRS TAK GTL AAK GCL 768  
241 Val Cys Arg Ala Phe Leu Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Tyr Val Asn Ala 256

769 ACL AAK ATM TTK AAK GAK QRS AAK CAJ ACL WGZ GGL TAK GAK TAK CAK 816  
257 Thr Asn Ile Phe Asn Asp Ser Asn Gln Thr Arg Gly Tyr Asp Tyr His 272

11

12

817 AAJ GGL CAJ TGG WZ GAK TTK GTL XTY AAJ GGL CAK ACL AAK QRS AAK 864  
273 Lys Gly Gln Trp Arg Asp Phe Val Leu Lys Gly His Thr Asn Ser Asn 288

865 WZ WZ GTL GAK TAK QRS AAK GAJ ATM AAK CCL GTL GGL ACL CCL GAJ 912  
289 Arg Arg Val Asp Tyr Ser Asn Glu Ile Asn Pro Val Gly Thr Pro Glu 304

913 GAJ TGG ATM QRS ATM ATM CAJ WZ GAK ATM GAK GCL ACL GGL ATM ACL 960  
305 Glu Cys Ile Ser Ile Ile Gln Arg Asp Ile Asp Ala Thr Gly Ile Thr 320

961 AAK ATM ACL TGG GGL TTK GAJ GCL AAK GGL QRS GAJ GAJ GAJ ATM GTL1008  
321 Asn Ile Thr Cys Gly Phe Glu Ala Asn Gly Ser Glu Glu Glu Ile Val 336

1009 GCL QRS ATG ATM WZ TTK ATG ACL CAJ GTL GCL CCL TTK XTY AAJ GAK1056  
337 Ala Ser Met Gly Arg Phe Met Thr Gln Val Ala Pro Phe Leu Lys Asp 352

1057 CCL QRS \*\*\*

353 Pro Ser

(ただし、塩基の3文字連鎖は、左側に5'末端を、右側に3'末端を表わしている。この文字はヌクレオチド配列を形成するプリン又はピリミジン塩基を表わす。また、

A: アデニン、  
G: グアニン、  
C: シトシン、  
J: AもしくはG、  
K: TもしくはC、  
L: A, T, CもしくはG、  
M: A, CもしくはT、  
T: チミン、  
X: YがAもしくはGの場合はTまたはC、或いはYがCもしくはTの場合はC、  
Y: XがCの場合はA, G, CまたはT、或いはXがTの場合はAまたはG、  
W: ZがCもしくはTの場合はCまたはA、或いはZがCもしくはTの場合はC、

\* Z: WがGの場合はA, G, CまたはT、或いはWがAの場合はAまたはG、

20 GR: SがA, G, CまたはTの場合はTC、\*\*\*はTAA, TAGもしくはTGAを表す。)

【0025】配列番号: 2

配列の長さ: 984

配列の型: 核酸

鎖の数: 1

トポロジー: 直鎖

配列の種類: ゲノムDNA

起源

生物名: Alteromonas hanedai

株名: ATCC33224

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

特徴を決定した方法: E

【0026】

配列

1 ATG AAJ TTK GGL XTY TTK TTK XTY AAK TTK CAJ XTY GAK GGL ATG ACL 48  
1 Met Lys Phe Gly Leu Phe Phe Leu Asn Phe Gln Leu Asp Gly Met Thr 16

49 QRS GAJ AAK ACL XTY GAK AAK ATG GTL QRS ATG GTL QRS XTY GTL GAK 96  
17 Ser Glu Asn Thr Leu Asp Asn Met Val Ser Met Val Ser Leu Val Asp 32

97 GCL GAK GAJ TAK CAK TTK GAK ACL GTL XTY ATM TAK GAJ CAK CAK TTK 144  
33 Ala Asp Glu Tyr His Phe Asp Thr Val Leu Ile Tyr Glu His His Phe 48

145 QRS AAJ QRS GGL ATM ATM GCL QRS CCL ATM ACL GCL GCL GGL TTK XTY 192  
49 Ser Lys Ser Gly Ile Ile Ala Ser Pro Ile Thr Ala Ala Gly Phe Leu 64

193 XTY GGL XTY ACL AAK WZ XTY CAK ATM GGL QRS XTY AAK CAJ GTL ATM 240  
65 Leu Gly Leu Thr Asn Arg Leu His Ile Gly Ser Leu Asn Gln Val Ile 80

241 ACL ACL CAK CAK CCL GTL WGZ GTL GCL GAJ GAJ QRS QRS XTY XTY GAK 288  
 81 Thr Thr His His Pro Val Arg Val Ala Glu Glu Ser Ser Leu Leu Asp 96  
  
 289 CAJ ATG QRS GAJ GGL WGZ TTK ATM XTY GGL TTK QRS AAK QRS GAJ AAK 336  
 97 Gln Met Ser Glu Gly Arg Phe Ile Leu Gly Phe Ser Asn Ser Glu Asn 112  
  
 337 GAK TTK GAJ ATG GAK TTK TTK AAJ WGZ AAK XTY GCL QRS WGZ CAJ CAJ 384  
 113 Asp Phe Glu Met Asp Phe Phe Lys Arg Asn Leu Ala Ser Arg Gln Gln 128  
  
 385 CAJ TTK GAJ GCL TTK TAK GAK ATM ATM AAK GAJ GCL XTY ACL ACL GGL 432  
 129 Gln Phe Glu Ala Cys Tyr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Leu Thr Thr Gly 144  
  
 433 TAK TTK CAK CCL CAJ AAK GAK TTK TAK GAK TTK CCL AAJ GTL QRS ATM 480  
 145 Tyr Cys His Pro Gln Asn Asp Phe Tyr Asp Phe Pro Lys Val Ser Ile 160  
  
 481 AAK CCL CAK TTK TTK QRS AAJ AAK GGL CCL AAJ CAJ TAK GTL GTL GCL 528  
 161 Asn Pro His Cys Phe Ser Lys Asn Gly Pro Lys Gln Tyr Val Val Ala 176  
  
 529 ACL QRS AAJ QRS GTL GTL GAJ TGG GCL GCL AAJ AAK GCL XTY QRS XTY 576  
 177 Thr Ser Lys Ser Val Val Glu Trp Ala Ala Lys Asn Ala Leu Ser Leu 192  
  
 577 ACL TTK AAJ TGG GAK GAK QRS XTY GCL GAK AAJ GAJ QRS TAK GCL ATG 624  
 193 Thr Phe Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Asp Lys Glu Ser Tyr Ala Met 208  
  
 625 XTY TAK AAK GAJ ATM GCL ATG WGZ TAK GGL ATM GAK ATM QRS AAK GTL 672  
 209 Leu Tyr Asn Glu Ile Ala Met Arg Tyr Gly Ile Asp Ile Ser Asn Val 224  
  
 673 GAJ CAK CAJ XTY ACL GTL ATM GTL AAK XTY AAK GCL GAK GGL GAK XTY 720  
 225 Glu His Gln Leu Thr Val Ile Val Asn Leu Asn Ala Asp Gly Asp Leu 240  
  
 721 GCL WGZ GAK GAJ GCL AAJ GGL TAK XTY AAJ AAK TAK ATM GTL GAJ ACL 768  
 241 Ala Arg Asp Glu Ala Lys Gly Tyr Leu Lys Asn Tyr Ile Val Glu Thr 256  
  
 769 TAK CCL GAK ATM GAK CAK GTL GCL AAJ ATM AAK QRS ATM ATM GCL GAJ 816  
 257 Tyr Pro Asp Ile Asp His Val Ala Lys Ile Asn Ser Ile Ile Ala Glu 272  
  
 817 AAK GCL ATM GGL ACL GAR GCL GAJ TAK TAK GAK CAJ ATM AAJ XTY GCL 864  
 273 Asn Ala Ile Gly Thr Asp Ala Glu Tyr Tyr Asp Gln Ile Lys Leu Ala 288  
  
 865 GTL GAJ AAJ ACL GGL GTL AAJ AAJ ATM XTY XTY QRS TTK GAJ QRS ATG 912  
 289 Val Glu Lys Thr Gly Val Lys Lys Ile Leu Leu Ser Phe Glu Ser Met 304  
  
 913 AAJ GAK QRS AAK GAK GTL AAJ AAK ATM ATM AAK ATG GCL AAK GAK AAJ 960  
 305 Lys Asp Ser Asn Asp Val Lys Asn Ile Ile Asn Met Ala Asn Asp Lys 320  
  
 961 ATM QRS AAJ AAK ATM AAJ GCL \*\*\*  
 321 Ile Ser Lys Asn Ile Lys Ala

(ただし、塩基の3文字連鎖は、左側に5'末端を、右側に3'末端を表わしている。この文字はヌクレオチド配列を形成するプリン又はピリミジン塩基を表わす。また、50



15

A: アデニン、  
 G: グアニン、  
 C: シトシン、  
 J: AもしくはG、  
 K: TもしくはC、  
 L: A, T, CもしくはG、  
 M: A, CもしくはT、  
 T: チミン、  
 X: YがAもしくはGの場合はTまたはC、或いはYがCもしくはTの場合はC、  
 Y: XがCの場合はA, G, CまたはT、或いはXがTの場合はAまたはG、  
 W: ZがCもしくはTの場合はCまたはA、或いはZがCもしくはTの場合はC、  
 Z: WがGの場合はA, G, CまたはT、或いはWがAの場合はAまたはG、

\*

## 配列

1 ATG AAG TTC GGA AAT ATT TGT TTT TCA TAT CAA CCG CCT GGT GAG ACT 48  
 1 Met Lys Phe Gly Asn Ile Cys Phe Ser Tyr Gln Pro Pro Gly Glu Thr 16

49 CAT AAA CAG GTA ATG GAT CGT TTT ATT CGA CTT GGC GTT GCT TCG GAA 96  
 17 His Lys Gln Val Met Asp Arg Phe Ile Arg Leu Gly Val Ala Ser Glu 32

97 GAA CTT GGC TTT GAT ACA TAC TGG ACT CTG GAG CAC CAT TTT ACT GAG 144  
 33 Glu Leu Gly Phe Asp Thr Tyr Trp Thr Leu Glu His His Phe Thr Glu 48

145 TTC GGT CTT ACT GGT AAC CTT TTT GTT GCT GCA GCA AAT CTA CTT GGC 192  
 49 Phe Gly Leu Thr Gly Asn Leu Phe Val Ala Ala Ala Asn Leu Leu Gly 64

193 CGA ACT AAA ACA CTG CAA GTT GGG ACG ATG GGG GTT GTA CTC CCT ACA 240  
 65 Arg Thr Lys Thr Leu Gln Val Gly Thr Met Gly Val Val Leu Pro Thr 80

241 GCT CAT CCA GTT CGA CAA CTA GAA GAT GTA TTG TTA TTG GAT CAA ATG 288  
 81 Ala His Pro Val Arg Gln Leu Glu Asp Val Leu Leu Leu Asp Gln Met 96

289 TCT AAA GGT CGT TTT AAT TTT GGC GTT GTT CGA GGT TTA TAC CAT AAA 336  
 97 Ser Lys Gly Arg Phe Asn Phe Gly Val Val Arg Gly Leu Tyr His Lys 112

337 GAT TTC AGG GTA TTT GGC GTC AAT ATG GAA GAC TCA CGC GGG ATA ACT 384  
 113 Asp Phe Arg Val Phe Gly Val Asn Met Gly Asp Ser Arg Gly Ile Thr 128

385 CAA AGC TTC CAT ACC ATG ATC ATT GAT GGC GTA AAA ACG GGA CGT ATA 432  
 129 Gln Ser Phe His Thr Met Ile Ile Asp Gly Val Lys Thr Gly Arg Ile 144

433 AGC TCA GAT GGG GAA CAT ATA GAG TTC CCA GAA GTT GAG GTA TAT CCA 480  
 145 Ser Ser Asp Gly Glu His Ile Glu Phe Pro Glu Val Glu Val Tyr Pro 160

481 ACA GCT TAT TCA AAG GAG CTC CCA ACG TGT ATG ACA GCG GAG TCA GCT 528  
 161 Thr Ala Tyr Ser Lys Glu Leu Pro Thr Cys Met Thr Ala Glu Ser Ala 176

16

\*GR: SがA, G, CまたはTの場合はTC、\*\*\*はTAA, TAGもしくはTGAを表す。)

【0027】配列番号: 3

配列の長さ: 1065

配列の型: 核酸

鎖の数: 1

トポロジー: 直鎖

配列の種類: ゲノムDNA

起源

10 生物名: Alteromonas hanedai

株名: ATCC33224

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

特徴を決定した方法: E

【0028】

17  
 529 AGC ACA ACG GAG TGG TTA GCT GAG CGG GGA TTG CCA ATG GTG CTT AGC 576  
 177 Ser Thr Thr Glu Trp Leu Ala Glu Arg Gly Leu Pro Met Val Leu Ser 192

18  
 577 TGG ATA ATT GGA ACC AAC GAG AAA AAA GCG CAA ATG GAA CTT TAT AAT 624  
 193 Trp Ile Ile Gly Thr Asn Glu Lys Lys Ala Gln Met Glu Leu Tyr Asn 208

625 GAA ATT GCG ATA GAG CAT GGT CAT GAT ATT ACT AAG ATT GAT CAT TGT 672  
 209 Glu Ile Ala Ile Glu His Gly His Asp Ile Thr Lys Ile Asp His Cys 224

673 ATG ACA TTT ATA TGC TCA GTG GAT AAT GAT AGT AAT AAG GCA CGT GAT 720  
 225 Met Thr Phe Ile Cys Ser Val Asp Asn Asp Ser Asn Lys Ala Arg Asp 240

721 GTA TGC CGT GCT TTT CTT GCT AAT TGG TAT GAC TCT TAT GTT AAT GCT 768  
 241 Val Cys Arg Ala Phe Leu Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Tyr Val Asn Ala 256

769 ACC AAC ATA TTC AAT GAT AGC AAC CAA ACT CGT GGC TAT GAC TAT CAC 816  
 257 Thr Asn Ile Phe Asn Asp Ser Asn Gln Thr Arg Gly Tyr Asp Tyr His 272

817 AAA GGT CAG TGG AGA GAT TTT GTA CTA AAA GGT CAT ACA AAT AGC AAC 864  
 273 Lys Gly Gln Trp Arg Asp Phe Val Leu Lys Gly His Thr Asn Ser Asn 288

865 AGA CGT GTT GAT TAC AGT AAT GAA ATT AAC CCT GTA GGC ACA CCT GAA 912  
 289 Arg Arg Val Asp Tyr Ser Asn Glu Ile Asn Pro Val Gly Thr Pro Glu 304

913 GAA TGT ATT TCA ATT ATT CAA CGT GAC ATT GAT GCG ACC GGT ATT ACT 960  
 305 Glu Cys Ile Ser Ile Ile Gln Arg Asp Ile Asp Ala Thr Gly Ile Thr 320

961 AAT ATC ACC TGT GGG TTT GAA GCA AAT GGT AGT GAA GAG GAA ATA GTG1008  
 321 Asn Ile Thr Cys Gly Phe Glu Ala Asn Gly Ser Glu Glu Glu Ile Val 336

1009 GCT TCT ATG GGA CGG TTT ATG ACA CAA GTG GCT CCT TTT TTG AAA GAC1056  
 337 Ala Ser Met Gly Arg Phe Met Thr Gln Val Ala Pro Phe Leu Lys Asp 352

1057 CCT AGC TAG  
 353 Pro Ser \*\*\*\*

【0029】配列番号：4

配列の長さ：984

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖

配列の種類：ゲノムDNA

起源

\*生物名：Alteromonas hanedai

株名：ATCC33224

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

40 特徴を決定した方法：E

【0030】

\*

配列

1 ATG AAA TTT GGA TTG TTT TTC CTC AAC TTT CAG CTA GAT GGT ATG ACT 48

1 Met Lys Phe Gly Leu Phe Phe Leu Asn Phe Gln Leu Asp Gly Met Thr 16

49 TCA GAA AAC ACT TTA GAT AAT ATG GTG AGC ATG GTG TCT CTT GTT GAT 96

17 Ser Glu Asn Thr Leu Asp Asn Met Val Ser Met Val Ser Leu Val Asp 32

97 GCT GAT GAA TAT CAT TTT GAT ACA GTA CTC ATA TAC GAA CAT CAT TTT 144

19

20

33 Ala Asp Glu Tyr His Phe Asp Thr Val Leu Ile Tyr Glu His His Phe 48  
 145 TCT AAA AGT GGC ATT ATA GCT TCA CCT ATT ACA GCG GCT GGT TTT TTA 192  
 49 Ser Lys Ser Gly Ile Ile Ala Ser Pro Ile Thr Ala Ala Gly Phe Leu 64  
 193 CTT GGA TTG ACT AAT AGG CTG CAT ATT GGC TCT TTA AAT CAA GTT ATT 240  
 65 Leu Gly Leu Thr Asn Arg Leu His Ile Gly Ser Leu Asn Gln Val Ile 80  
 241 ACA ACT CAC CAT CCA GTA CGT GTT GCC GAG GAA TCA AGT TTA TTA GAC 288  
 81 Thr Thr His His Pro Val Arg Val Ala Glu Glu Ser Ser Leu Leu Asp 96  
 289 CAG ATG TCT GAA GGT CGT TTC ATT CTG GGA TTC AGC AAT AGT GAA AAC 336  
 97 Gln Met Ser Glu Gly Arg Phe Ile Leu Gly Phe Ser Asn Ser Glu Asn 112  
 337 GAC TTT GAA ATG GAT TTC TTT AAA CGT AAT TTA GCA TCT CGG CAA CAG 384  
 113 Asp Phe Glu Met Asp Phe Phe Lys Arg Asn Leu Ala Ser Arg Gln Gln 128  
 385 CAA TTT GAA GCT TGT TAT GAC ATC ATT AAT GAG GCG TTG ACG ACT GGA 432  
 129 Gln Phe Glu Ala Cys Tyr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Leu Thr Thr Gly 144  
 433 TAT TGC CAC CCT CAA AAT GAT TTT TAC GAT TTC CCT AAA GTG TCA ATA 480  
 145 Tyr Cys His Pro Gln Asn Asp Phe Tyr Asp Phe Pro Lys Val Ser Ile 160  
 481 AAC CCA CAT TGT TTT AGT AAA AAT GGG CCT AAG CAG TAT GTA GTA GCA 528  
 161 Asn Pro His Cys Phe Ser Lys Asn Gly Pro Lys Gln Tyr Val Val Ala 176  
 529 ACA AGT AAA AGT GTC GTT GAA TGG GCC GCT AAA AAT GCA TTG TCT CTG 576  
 177 Thr Ser Lys Ser Val Val Glu Trp Ala Ala Lys Asn Ala Leu Ser Leu 192  
 577 ACG TTT AAA TGG GAT GAT AGT CTT GCA GAT AAA GAA AGT TAT GCA ATG 624  
 193 Thr Phe Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Asp Lys Glu Ser Tyr Ala Met 208  
 625 CTT TAT AAT GAA ATT GCG ATG CGT TAT GGT ATT GAC ATT TCA AAT GTA 672  
 209 Leu Tyr Asn Glu Ile Ala Met Arg Tyr Gly Ile Asp Ile Ser Asn Val 224  
 673 GAG CAC CAA CTT ACA GTC ATT GTC AAT TTG AAT GCT GAT GGT GAT TTA 720  
 225 Glu His Gln Leu Thr Val Ile Val Asn Leu Asn Ala Asp Gly Asp Leu 240  
 721 GCT CGC GAT GAA GCT AAG GGG TAC TTG AAA AAC TAT ATT GTT GAA ACA 768  
 241 Ala Arg Asp Glu Ala Lys Gly Tyr Leu Lys Asn Tyr Ile Val Glu Thr 256  
 769 TAT CCA GAC ATC GAT CAT GTG GCT AAA ATA AAT TCA ATC ATT GCA GAG 816  
 257 Tyr Pro Asp Ile Asp His Val Ala Lys Ile Asn Ser Ile Ile Ala Glu 272  
 817 AAC GCG ATT GGT ACT GAT GCC GAG TAT TAT GAC CAA ATT AAA CTA GCA 864  
 273 Asn Ala Ile Gly Thr Asp Ala Glu Tyr Tyr Asp Gln Ile Lys Leu Ala 288  
 865 GTT GAA AAA ACA GGA GTT AAA AAA ATT CTG TTA TCA TTT GAA TCC ATG 912  
 289 Val Glu Lys Thr Gly Val Lys Lys Ile Leu Leu Ser Phe Glu Ser Met 304

21

22

913 AAG GAT TCA AAT GAT GTT AAA AAT ATT ATT AAT ATG GCA AAT GAC AAA 960  
 305 Lys Asp Ser Asn Asp Val Lys Asn Ile Ile Asn Met Ala Asn Asp Lys 320

961 ATA TCT AAA AAT ATT AAG GCA TAG

321 Ile Ser Lys Asn Ile Lys Ala \*\*\*

【0031】配列番号：5

配列の長さ：2124

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖

配列の種類：ゲノムDNA

起源

\*生物名：Alteromonas hanedai

株名：ATCC33224

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

10 存在位置：38-1102, 1141-2124

特徴を決定した方法：E

\* 【0032】

配列

10	20	30	40	50
5'-TAGTCTATCC CGGTTATATA AAATAAAGGA AATAATTATG AAGTTCGGAA				
60	70	80	90	100
ATATTTGTTT TTCATATCAA CCGCCTGGTG AGACTCATAA ACAGGTAATG				
110	120	130	140	150
GATCGTITTA TTCGACTTGG CGTTGCTTCG GAAGAAGCTG GCTTTGATAC				
160	170	180	190	200
ATACTGGACT CTGGAGCACC ATTTTACTGA GTTCGGTCTT ACTGGTAACC				
210	220	230	240	250
TTTTTGTTCG TGCAGCAAAT CTAAGTGGCC GAACTAAAAC ACTGCAAGTT				
260	270	280	290	300
GGGACGATGG GGGTTGACT CCCTACAGCT CATCCAGTTC GACAACTAGA				
310	320	330	340	350
AGATGTATTG TTATTGGATC AAATGTCTAA AGGTCGTTTT AATTTTGGCG				
360	370	380	390	400
TTGTTTCGAGG TTTATACCAT AAAGATTCA GGGTATTTGG CGTCAATATG				
410	420	430	440	450
GAAGACTCAC GCGGGATAAC TCAAAGCTTC CATACCATGA TCATTGATGG				
460	470	480	490	500
CGTAAAAACG GGACGTATAA GCTCAGATGG GGAACATATA GAGTTCCCAG				
510	520	530	540	550
AAGTTGAGGT ATATCCAACA GCTTATTCAA AGGAGCTCCC AACGTGTATG				
560	570	580	590	600
ACAGCGGAGT CAGCTAGCAC AACGGAGTGG TTAGCTGAGC GGGGATTGCC				
610	620	630	640	650
AATGGTGCTT AGCTGGATAA TTGGAACCAA CGAGAAAAAA GCGCAAATGG				
660	670	680	690	700
AACTTTATAA TGAAATTGCG ATAGAGCATG GTCATGATAT TACTAAGATT				
710	720	730	740	750
GATCATTTGA TGACATTTAT ATGCTCAGTG GATAATGATA GTAATAAGGC				
760	770	780	790	800
ACGTGATGTA TGCCGTGCTT TTCCTGCTAA TTGGTATGAC TCTTATGTTA				
810	820	830	840	850
ATGCTACCAA CATATTCAAT GATAGCAACC AAACCTGTGG CTATGACTAT				
860	870	880	890	900
CACAAAGGTC AGTGGAGAGA TTTTGTACTA AAAGGTCATA CAAATAGCAA				
910	920	930	940	950

23

24

CAGACGTGTT GATTACAGTA ATGAAATTAA CCCTGTAGGC ACACCTGAAG  
 960 970 980 990 1000  
 AATGTATTTC AATTATTCAA CGTGACATTG ATGCGACCGG TATTACTAAT  
 1010 1020 1030 1040 1050  
 ATCACCTGTG GGTTTGAAGC AAATGGTAGT GAAGAGGAAA TAGTGGCTTC  
 1060 1070 1080 1090 1100  
 TATGGGACGG TTTATGACAC AAGTGGCTCC TTTTGTGAAA GACCCTAGCT  
 1110 1120 1130 1140 1150  
 AGTCATTAAT ACATTTAATT AAATATAGTA AGGAAATATT ATGAAATTTG  
 1160 1170 1180 1190 1200  
 GATTGTTTTT CCTCACTTT CAGCTAGATG GTATGACTTC AGAAAACACT  
 1210 1220 1230 1240 1250  
 TTAGATAATA TGGTGAGCAT GGTGTCTCTT GTTGATGCTG ATGAATATCA  
 1260 1270 1280 1290 1300  
 TTTTGATACA GTACTCATAT ACGAACATCA TTTTCTAAA AGTGGCATT  
 1310 1320 1330 1340 1350  
 TAGCTTCACC TATTACAGCG GCTGGTTTTT TACTTGGATT GACTAATAGG  
 1360 1370 1380 1390 1400  
 CTGCATATTG GCTCTTTAAA TCAAGTIATT ACAACTCACC ATCCAGTACG  
 1410 1420 1430 1440 1450  
 TGTGCGCGAG GAATCAAGTT TATTAGACCA GATGTCTGAA GGTGCTTCA  
 1460 1470 1480 1490 1500  
 TTCTGGGATT CAGCAATAGT GAAAACGACT TTGAAATGGA TTCTTTAAA  
 1510 1520 1530 1540 1550  
 CGTAATTTAG CATCTCGGCA ACAGCAATTT GAAGCTTGTT ATGACATCAT  
 1560 1570 1580 1590 1600  
 TAATGAGGCG TTGACGACTG GATATTGCCA CCCTCAAAAT GATTTTACG  
 1610 1620 1630 1640 1650  
 ATTTCCCTAA AGTGTCAATA AACCCACATT GTTTTAGTAA AAATGGGCCT  
 1660 1670 1680 1690 1700  
 AAGCAGTATG TAGTAGCAAC AAGTAAAAGT GTCGTTGAAT GGGCCGCTAA  
 1710 1720 1730 1740 1750  
 AAATGCATTG TCTCTGACGT TTAAATGGGA TGATAGTCTT GCAGATAAAG  
 1760 1770 1780 1790 1800  
 AAAGTTATGC AATGCITTAT AATGAAATTG CGATGCGTTA TGGTATTGAC  
 1810 1820 1830 1840 1850  
 ATTTCAAATG TAGAGCACCA ACTTACAGTC ATTGTCAATT TGAATGCTGA  
 1860 1870 1880 1890 1900  
 TGGTGATTTA GCTCGCGATG AAGCTAAGGG GACTTGAAA AACTATATTG  
 1910 1920 1930 1940 1950  
 TTGAAACATA TCCAGACATC GATCATGTGG CTAAAATAAA TTCAATCATT  
 1960 1970 1980 1990 2000  
 GCAGAGAACG CGATTGGTAC TGATGCCGAG TATTATGACC AAATTAAACT  
 2010 2020 2030 2040 2050  
 AGCAGTTGAA AAAACAGGAG TTAATAAAT TCTGTTATCA TTTGAATCCA  
 2060 2070 2080 2090 2100  
 TGAAGGATTC AAATGATGTT AAAAATATTA TTAATATGGC AAATGACAAA  
 2110 2120 2130 2140 2150  
 ATATCTAAAA ATATTAAGGC ATAG-3'

(14)

特開平7-222590

25

26

配列の型：アミノ酸

\*【0034】

配列の種類：タンパク質

\*

配列

10

N- Met Lys Phe Gly Asn Ile Cys Phe Ser Tyr Gln Pro Pro Gly Glu Thr  
 20 30  
 His Lys Gln Val Met Asp Arg Phe Ile Arg Leu Gly Val Ala Ser Glu  
 40  
 Glu Leu Gly Phe Asp Thr Tyr Trp Thr Leu Glu His His Phe Thr Glu  
 50 60  
 Phe Gly Leu Thr Gly Asn Leu Phe Val Ala Ala Ala Asn Leu Leu Gly  
 70 80  
 Arg Thr Lys Thr Leu Gln Val Gly Thr Met Gly Val Val Leu Pro Thr  
 90  
 Ala His Pro Val Arg Gln Leu Glu Asp Val Leu Leu Leu Asp Gln Met  
 100 110  
 Ser Lys Gly Arg Phe Asn Phe Gly Val Val Arg Gly Leu Tyr His Lys  
 120  
 Asp Phe Arg Val Phe Gly Val Asn Met Glu Asp Ser Arg Gly Ile Thr  
 130 140  
 Gln Ser Phe His Thr Met Ile Ile Asp Gly Val Lys Thr Gly Arg Ile  
 150 160  
 Ser Ser Asp Gly Glu His Ile Glu Phe Pro Glu Val Glu Val Tyr Pro  
 170  
 Thr Ala Tyr Ser Lys Glu Leu Pro Thr Cys Met Thr Ala Glu Ser Ala  
 180 190  
 Ser Thr Thr Glu Trp Leu Ala Glu Arg Gly Leu Pro Met Val Leu Ser  
 200  
 Trp Ile Ile Gly Thr Asn Glu Lys Lys Ala Gln Met Glu Leu Tyr Asn  
 210 220  
 Glu Ile Ala Ile Glu His Gly His Asp Ile Thr Lys Ile Asp His Cys  
 230 240  
 Met Thr Phe Ile Cys Ser Val Asp Asn Asp Ser Asn Lys Ala Arg Asp  
 250  
 Val Cys Arg Ala Phe Leu Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Tyr Val Asn Ala  
 260 270  
 Thr Asn Ile Phe Asn Asp Ser Asn Gln Thr Arg Gly Tyr Asp Tyr His  
 280  
 Lys Gly Gln Trp Arg Asp Phe Val Leu Lys Gly His Thr Asn Ser Asn  
 290 300  
 Arg Arg Val Asp Tyr Ser Asn Glu Ile Asn Pro Val Gly Thr Pro Glu  
 310 320  
 Glu Cys Ile Ser Ile Ile Gln Arg Asp Ile Asp Ala Thr Gly Ile Thr  
 330  
 Asn Ile Thr Cys Gly Phe Glu Ala Asn Gly Ser Glu Glu Glu Ile Val  
 340 350  
 Ala Ser Met Gly Arg Phe Met Thr Gln Val Ala Pro Phe Leu Lys Asp  
 Pro Ser \*\*\* -C

【0035】配列番号：7

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：327

50 配列の種類：タンパク質

【 0 0 3 6 】

配列

28

10

N- Met Lys Phe Gly Leu Phe Phe Leu Asn Phe Gln Leu Asp Gly Met Thr  
20 30  
Ser Glu Asn Thr Leu Asp Asn Met Val Ser Met Val Ser Leu Val Asp  
40  
Ala Asp Glu Tyr His Phe Asp Thr Val Leu Ile Tyr Glu His His Phe  
50 60  
Ser Lys Ser Gly Ile Ile Ala Ser Pro Ile Thr Ala Ala Gly Phe Leu  
70 80  
Leu Gly Leu Thr Asn Arg Leu His Ile Gly Ser Leu Asn Gln Val Ile  
90  
Thr Thr His His Pro Val Arg Val Ala Glu Glu Ser Ser Leu Leu Asp  
100 110  
Gln Met Ser Glu Gly Arg Phe Ile Leu Gly Phe Ser Asn Ser Glu Asn  
120  
Asp Phe Glu Met Asp Phe Phe Lys Arg Asn Leu Ala Ser Arg Gln Gln  
130 140  
Gln Phe Glu Ala Cys Tyr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Leu Thr Thr Gly  
150 160  
Tyr Cys His Pro Gln Asn Asp Phe Tyr Asp Phe Pro Lys Val Ser Ile  
170  
Asn Pro His Cys Phe Ser Lys Asn Gly Pro Lys Gln Tyr Val Val Ala  
180 190  
Thr Ser Lys Ser Val Val Glu Trp Ala Ala Lys Asn Ala Leu Ser Leu  
200  
Thr Phe Lys Trp Asp Asp Ser Leu Ala Asp Lys Glu Ser Tyr Ala Met  
210 220  
Leu Tyr Asn Glu Ile Ala Met Arg Tyr Gly Ile Asp Ile Ser Asn Val  
230 240  
Glu His Gln Leu Thr Val Ile Val Asn Leu Asn Ala Asp Gly Asp Leu  
250  
Ala Arg Asp Glu Ala Lys Gly Tyr Leu Lys Asn Tyr Ile Val Glu Thr  
260 270  
Tyr Pro Asp Ile Asp His Val Ala Lys Ile Asn Ser Ile Ile Ala Glu  
280  
Asn Ala Ile Gly Thr Asp Ala Glu Tyr Tyr Asp Gln Ile Lys Leu Ala  
290 300  
Val Glu Lys Thr Gly Val Lys Lys Ile Leu Leu Ser Phe Glu Ser Met  
310 320  
Lys Asp Ser Asn Asp Val Lys Asn Ile Ile Asn Met Ala Asn Asp Lys  
Ile Ser Lys Asn Ile Lys Ala \*\*\* -C

【図面の簡単な説明】

【図1】細菌ルシフェラーゼ $\alpha$ サブユニットの保存されたアミノ酸配列と合成オリゴヌクレオチド・プライマー。

【図2】本発明の酵素遺伝子の制限酵素地図を示す。矢印で示したところが、酵素の構造遺伝子部分に相当する。

B B a m H I

X      X b a l

H H i n d l l l

S      S a l l

luxA ルシフェラーゼ  $\alpha$  サブユニット遺伝子luxB      ルシフェラーゼ  $\beta$  サブユニット遺伝子

50 矢印の方向は、転写の方向を示す。

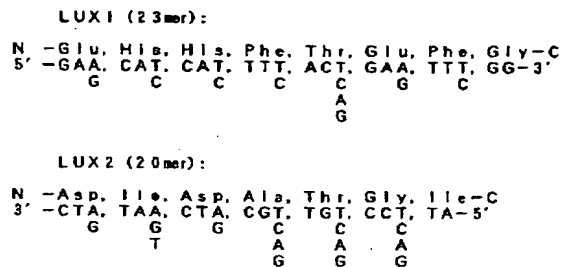
【図3】本発明に係る発光細菌のルシフェラーゼ遺伝子を含有する本発明の発現ベクター pALF1 の構築工程を示す。矢印はルシフェラーゼ遺伝子のコーディング領域である。ボックスは大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター部分を示す。

luxA ルシフェラーゼ  $\alpha$  サブユニット遺伝子  
luxB ルシフェラーゼ  $\beta$  サブユニット遺伝子  
lacP ラクトースオペロンのプロモーター  
矢印の方向は、転写の方向を示す。

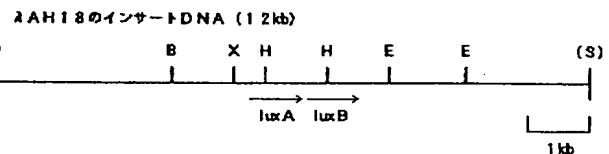
【符号の説明】

lacP ラクトースオペロンのプロモーター  
pUC13 プラスミド・ベクター  
pAH18 組換えベクター  
pALF1 発現ベクター  
BamHI 制限酵素  
XbaI 制限酵素  
HindIII 制限酵素  
EcoRI 制限酵素  
SalI 制限酵素

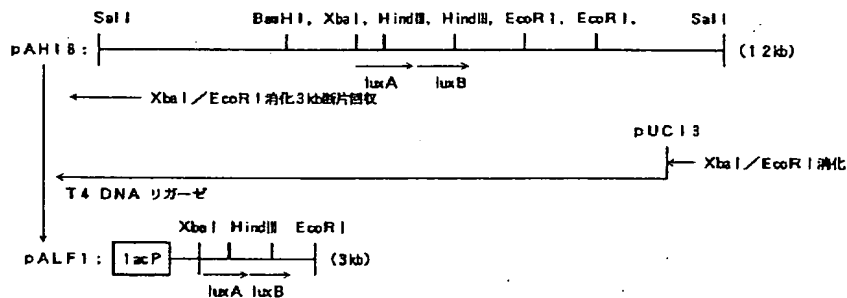
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/02

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:01)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**